

Aptitude à la transestérification de quelques lipases régiosélectives 1-3

II. — Taux de conversion et glycérides partiels en fonction de l'activité de l'eau des biocatalyseurs (1)

J. M. MUDERHWA, M. PINA et J. GRAILLE (2)

Résumé. — La mise au point des réactions d'interesterification biocatalysée en milieu fondu par des lipases régiosélectives 1-3, sélectionnées précédemment pour leur activité de transestérification, nécessite d'étudier l'influence de l'activité de l'eau. L'étude de ce paramètre permet de définir les conditions d'hydratation idoines dans lesquelles les biocatalyseurs sont les plus performants et de minimiser la réaction parasite d'hydrolyse qui nuit à la qualité des produits obtenus dont les teneurs en acides gras libres et en glycérides partiels doivent être limitées au maximum. La simultanéité, voire la compétition des 2 réactions sont inévitables et il est impossible expérimentalement de déterminer un seuil d'activité de l'eau en deçà duquel l'hydrolyse ne pourrait s'effectuer. Les meilleurs résultats ont été obtenus dans tous les cas pour une activité de l'eau comprise entre 0,25 et 0,45 correspondant à des taux d'hydratation des milieux réactionnels de l'ordre de 0,5 % à 1 %.

INTRODUCTION

Après avoir mis au point une méthode fiable de détermination de l'activité de transestérification (AST) des biocatalyseurs, nous allons aborder l'étude de l'influence de l'activité de l'eau (a_w) paramètre essentiel, trop souvent négligé qui conditionne pourtant la qualité des produits obtenus par interestérification catalysée en milieu fondu par les lipases régiosélectives 1-3. L' a_w joue un rôle important et son effet n'est pas sans conséquences sur les taux de conversion et sur la formation des produits secondaires de la réaction.

En effet au cours de l'interesterification la réaction d'hydrolyse est quasi inévitable, car même en milieu fondu donc en présence d'une phase aqueuse limitée, une hydratation minimale de la protéine enzymatique est nécessaire pour lui assurer une conformation active. Or, aux faibles activités de l'eau, il existe avec les lipases un seuil de démarrage de la réaction d'hydrolyse. Des glycérides partiels ainsi que des acides gras libres sont formés ce qui réduit le rendement de resynthèse des nouveaux triglycérides [1].

Sur le plan industriel, ce phénomène compromet en quelque sorte la qualité des produits issus de l'interesterification. Ces produits secondaires forment des eutectiques avec les triglycérides ce qui modifie la cinétique de formation du réseau cristallin [2] pour l'élaboration des margarines. Toutefois les monoglycérides ainsi que les acides gras libres peuvent être éliminés ou extraits du mélange par les techniques de raffinage chimique ou physique ; il n'en est pas de même en ce qui concerne les diglycérides car aucune méthode actuellement ne permet de les éliminer correctement. Or les diglycérides ont un double effet notamment dans le cas de l'huile de palme qui nous intéresse plus particulièrement :

Influence sur la plasticité des matières grasses.

Loncin [3] a signalé que les eutectiques formés peuvent contribuer à réduire la proportion de la fraction « stéarine »

dans le processus de fractionnement. Dans le même ordre d'idée, Berger [4] fait observer qu'à 21 °C une huile de palme contenant 13 % de diglycérides a un rapport solide sur huile totale qui est inférieur de 80 % par rapport au mélange n'en contenant pas.

Quand à Jacosberg *et al.* [5], ils constatent qu'un accroissement des taux d'acides gras libres et de diglycérides se traduit par une diminution de la proportion de solide et par conséquent augmente la plasticité de l'huile de palme ou de ses fractions concrètes.

Influence sur le polymorphisme.

La proportion de diglycérides présente dans l'huile brute est en étroite relation avec son aptitude à cristalliser. L'huile de palme cristallise d'abord dans le système α , qui passe rapidement sous forme β' ou dans certaines circonstances sous forme $\beta' + \beta$. Berger [6] a montré que les diglycérides ralentissent la transformation de la phase α en phase β' , ce ralentissement dans la formation du réseau cristallin engendre des difficultés dans l'opération de fractionnement à basse température ainsi que dans l'étape de mise en température au cours de la production du substitut de beurre de cacao à partir de l'huile de palme. Généralement réduit à 12 % dans l'huile de palme pour produire ce substitut, il semble cependant préférable d'ajuster le taux de diglycérides à 6,5 %. Des observations analogues ont été faites par Yella Reddy [7] sur l'huile de *Shorea robusta*.

On perçoit donc l'importance dans la mise en œuvre des lipases en transestérification de dominer la réaction inverse d'hydrolyse. Afin de déterminer le seuil d'hydratation nécessaire au démarrage d'une réaction d'hydrolyse, il est nécessaire d'étudier l'AST des biocatalyseurs en fonction de l'activité de l'eau ; 3 biocatalyseurs régiosélectifs 1-3 sélectionnés antérieurement [8] (cellules dévitalisées de *Rhizopus arrhizus*, mycélium de *Candida deformans*, Lipozyme T_M c'est-à-dire la lipase de *Mucor miehei* immobilisée sur une résine macroporeuse échangeuses d'anions) ont été étudiés. A cet effet nous avons suivi le taux de conversion du système huile de coprah/stéarate de méthyle, déjà utilisé par ailleurs [8], rappelons que la réaction est suivie par l'incorporation de l'acide laurique dans la fraction stéarate de méthyle et par

(1) La 1^{re} partie de cette étude a paru dans le N° d'octobre d'*Oléagineux* (1988, 43, N° 10, p. 385-392)

(2) Division Chimie des Corps Gras - IRHO-CIRAD. B.P. 5035 34032 Montpellier Cedex (France).

l'estimation quantitative des glycérides partiels et des acides gras libres formés dans le mélange réactionnel.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Le matériel biologique et les principales méthodes analytiques ont été décrits précédemment [8], notamment les conditions opératoires de transestérification, les calculs de taux de conversion et les conditions chromatographiques en CCM et CPG.

Toutefois, pour la compréhension de cette partie II de notre étude sur l'aptitude à la transestérification des lipases régiosélectives 1-3, il nous paraît utile de détailler quelques points et de faire un bref rappel sur l'activité de l'eau.

Détermination de la quantité d'eau.

La teneur en eau des substrats et biocatalyseurs utilisés pour la transestérification est déterminée par la méthode de Karl Fisher à l'aide d'un titrimètre automatique à lecture directe AF3. La méthode étudiée par Rossel [9] repose sur la faculté de l'iode à réagir avec l'eau en présence de dioxyde de soufre.

Mesure de l'activité de l'eau.

Rappel théorique.

Le terme d'activité de l'eau (a_w) fut introduit par Lewis en 1923. L' a_w est reliée, par définition à la variation du potentiel chimique de l'eau. Cette variation s'exprime selon Touraine [10] dans le cas de l'eau considérée comme gaz réel, par la formule : $\mu(T, P) - \mu'(T, P) = RT \log(f/f')$ dans laquelle : $\mu'(T, P)$ est le potentiel chimique de l'eau dans le milieu étudié à une température et une pression données ; f est la fugacité de l'eau dans le milieu ; f' (T) est la fugacité de l'eau pure à la température T et à la pression totale P.

L'activité de l'eau est définie par le rapport $a_w = (p/p')$ T dans laquelle p = pression partielle de vapeur d'eau dans le milieu étudié ; p' = pression partielle de vapeur d'eau à l'état de référence, c'est-à-dire de l'eau pure à la même température.

L'activité de l'eau (a_w) et l'humidité relative (h_r) sont des grandeurs directement proportionnelles reliées par l'équation selon Cheftel [11] $a_w = h_r \cdot 10^{-2}$ où $h_r = p/p_o$ correspond à une température T, au rapport de la pression de vapeur d'eau p (en équilibre avec la substance) à la pression de vapeur saturante p_o .

L'humidité relative d'équilibre caractérise ainsi, selon Loncin [12] et Drapron [13], l'activité de l'eau dans le système, l'eau libre ayant par définition un coefficient d'activité égale à 1, équivalent à une h_r de 100 %.

Méthode analytique et appareillage.

L'activité de l'eau des substrats et des biocatalyseurs mis en œuvre a été mesurée à 25 °C avec le « Thermoconstanter humidat - TH₂ » de Novasina dont la température peut être présélectionnée entre 0 et 50 °C. Il s'agit d'un dispositif de mesure thermostaté dans lequel la température est maintenue constante par l'apport ou la cession forcée de chaleur suivant un processus accéléré. L'échantillon contenu dans une coupelle en plastique est placé dans la chambre de mesure. La tête de mesure est équipée d'un capteur de mesure d'humidité et de température basée sur la variation de la résistance d'un filament en fonction de la température et de l'humidité de son environnement immédiat ; l'humidité est donnée par lecture directe.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Le facteur fondamental régissant la réversibilité de l'action des lipases (synthèse ou hydrolyse) est la quantité d'eau ou plus exactement l'activité de l'eau. En vertu de la loi d'action ou masse, un pourcentage d'eau élevé (supérieur à quelques pour cent) provoque l'hydrolyse. Inversement un pourcentage d'eau maintenu faible par l'application d'une pression réduite ou par l'action d'un tamis moléculaire hydrophile, favorise la synthèse, la transestérification ou l'interesterification.

Ainsi, l'activité thermodynamique de l'eau, qui donne une image de l'intensité des interactions solvants-solutés est un paramètre plus important à prendre en compte indépendamment de la teneur en eau globale du milieu ; c'est ce paramètre qui permettra d'évaluer l'incidence directe de l'eau sur le taux de conversion et l'efficacité des lipases régiosélectives 1-3 étudiées.

Compte tenu des AST, des durées de réaction et des quantités de biocatalyseurs nécessaires pour les différents biocatalyseurs permettant d'obtenir des taux de conversions convenables, l'étude de l'activité de l'eau de la lipase immobilisée (Lipozyme T_M de *Mucor miehei*) a été séparée de celles des lipases cellulaires (*Candida deformans* et *Rhizopus arrhizus*).

1. — Cas du lipozyme T_M (lipase de *Mucor miehei*).

— Taux de conversion en fonction de l'activité de l'eau.

Le mélange réactionnel de base a la composition suivante : 2,5 g d'huile de coprah (% H₂O = 0,1), 55 mg de stéarate de méthyle (% H₂O = 0,28) et 0,102 mg de Lipozyme T_M (% H₂O = 4,59) soit 4 % (P/P) de catalyseur par rapport à la phase lipidique. Ce mélange contient 7,3 mg d'eau soit 0,27 %. Il paraît difficile de se situer en deçà de ce pourcentage dans la mesure où cela nécessiterait de modifier le conditionnement du biocatalyseur au risque de le dénaturer. Une série de réactions de transestérification s'effectue à 50 °C pendant 30 min en faisant varier la quantité d'eau de 7,3 mg à 807,3 mg en ajoutant dans chacun des mélanges réactionnels de base 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 100, 200, 400 et 800 mg d'eau.

Les activités de l'eau sont déterminées à 25 °C et le % molaire de C12 :0 incorporé dans la fraction esters méthyliques est mesuré. Le taux de conversion est ensuite calculé par rapport au % molaire de C12 :0 incorporé à l'équilibre, soit 32 % molaire dans ce cas (Tabl. I).

Le taux de conversion est maximal pour $a_{w,25^\circ}$ de 0,43, ce qui correspond à 12,3 mg d'eau totale soit 0,46 % d'eau dans le mélange réactionnel.

Pour cette activité de l'eau, le taux d'hydratation du Lipozyme T_M peut être estimé. En effet si l'on considère que l'affinité eau-enzyme est infiniment plus grande que l'affinité eau-corps gras, on peut affirmer que toute l'eau présente dans le milieu réactionnel sert à l'hydratation du lipozyme et que dans le mélange réactionnel de base, les 102 mg de lipozyme renferment 7,3 mg d'eau soit 6,7 %. La quantité d'eau correspondant à l'activité maximale de transestérification est de 12,4 mg et dans ces conditions l'hydratation du lipozyme est de 10,7 %. Ce résultat est en parfait accord avec celui de Hansen et Eigtved [14] qui ont montré que l'activité maximale du Lipozyme T_M est atteinte pour un taux d'hydratation de 10 %.

Le tableau I indique que l'activité de l'eau, jouant un rôle déterminant dans le déroulement de la réaction de transestérification, doit être maintenue entre 0,3 et 0,5. Pour des

TABLEAU I. — Taux de conversion en fonction de l'activité de l'eau
Transestérification catalysée par le Lipozyme T_M (4 % P/P)

Eau totale (mg)	7,3	12,3	17,3	27,3	37,3	47,3	57,3	107,3	207,3	407,3	807,3
Taux d'hydratation (%) du Lipozyme T _M	6,7	10,7	14,5	21,1	26,7	31,6	35,9	51,2	67,0	79,9	88,8
Taux d'hydratation (%) du mélange réactionnel	0,27	0,46	0,65	1,01	1,38	1,75	2,11	3,88	7,23	13,29	23,30
a _w 25 °C	0,33	0,43	0,59	0,72	0,77	0,81	0,86	0,88	0,90	0,93	0,95
12 · 0 (% molaire)	11,5	12,4	10,3	6,6	4,1	2,3	0,9	0,2	—	—	—
Taux de conversion (%)	36,1	38,8	32,4	20,6	12,8	7,3	2,8	0,6	—	—	—

valeurs supérieures à 0,5, le taux de conversion diminue progressivement et s'annule vers une a_w proche de 0,90.

La variation du taux d'hydratation du mélange réactionnel en fonction de l'activité de l'eau correspond à la courbe de sorption (Fig. 1). De forme sigmoïde, elle traduit d'après Drappon [13] le recouvrement de plusieurs phénomènes élémentaires qui se superposent plus ou moins et dans laquelle 3 zones peuvent être distinguées :

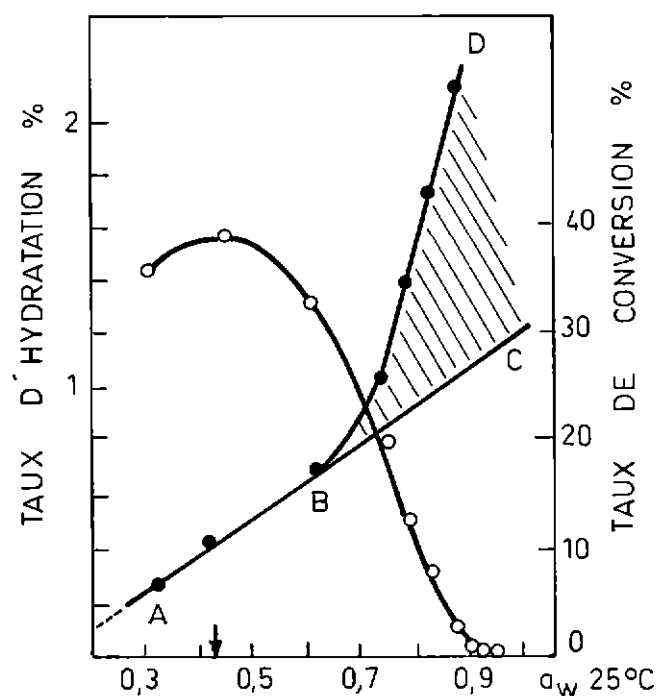


FIG 1 — Courbe de sorption - Transestérification catalysée par le lipozyme T_M
●—● taux d'hydratation, ○—○ taux de conversion

— la zone OA (a_w = 0 à 0,3) correspond à une adsorption d'eau par liaison hydrogène sur des sites fortement polaires ;

— la zone AB linéaire (a_w = 0,3 à 0,6) correspond aux molécules d'eau formant une ou plusieurs couches d'adsorption additionnelles mettant en jeu, d'après Kuntz et Kauzmann [15], des forces de nature plus faible du type liaisons de Van Der Waals et hydrophobes. Lorsque l'activité de l'eau croît, la substance dissout de l'eau pour former une solution solide en suivant la loi de proportionnalité de Henry. C'est cette zone qui coïncide avec l'intervalle où le taux de conversion est efficace et maximal ;

— la zone BD (a_w > 0,6) correspond à l'apparition d'une nouvelle phase aqueuse. Une quantité d'eau de plus en plus importante se fixe par des forces plus faibles de nature capillaire ou osmotique.

L'extrapolation de la partie linéaire définit une fraction d'eau très fortement liée à la surface des molécules par l'intermédiaire des liaisons hydrogène avec les groupements polaires accessibles.

Son extrapolation jusqu'à a_w = 1 (point C) représente en première approximation, la quantité d'eau totale fortement fixée à la matière sèche. La zone hachurée correspond à « l'eau solvante » d'après Guilbot et Linderberg [16] qui est encore fortement fixée puisque l'activité thermodynamique de l'eau est inférieure à celle de l'eau pure.

Ainsi, des écarts minimes dans l'activité de l'eau se répercutent directement sur l'AST et l'accroissement de l'activité de l'eau se caractérise par une augmentation de l'activité lipolitique comme en témoigne la présence des glycérides partiels et des acides gras libres que nous avons quantifiés (Tabl. II)

● Pour des valeurs de l'activité de l'eau de 0,3 à 0,6, correspondant à l'intervalle où le taux de conversion est maximal (zone AB linéaire Fig. 1), la réaction de transestérification est prépondérante par rapport à la réaction d'hy-

TABLEAU II. — Estimation des glycérides partiels et des acides gras libres apparus (exprimée en % pondéral) en fonction de l'activité de l'eau - Transestérification catalysée par le Lipozyme T_M (4 % P/P)

(1)	Activité de l'eau mesurée à 25 °C										
	0,33	0,43	0,59	0,72	0,77	0,81	0,86	0,88	0,90	0,93	0,95
EM	10,1	8,6	11,7	8,7	9,9	7,7	9,3	8,1	9,1	8,6	7,5
TG	84,3	82,6	76,6	75,8	72,2	71,8	67,9	67,5	64,6	61,3	59,7
AGL	3,0	5,0	7,0	9,4	10,9	12,8	14,3	15,3	16,3	19,0	20,5
DG	2,6	3,5	4,3	5,6	6,3	6,9	7,6	8,1	8,7	9,5	10,3
MG	—	0,3	0,4	0,5	0,7	0,8	0,9	1,0	1,3	1,6	2,0

(1) EM = esters méthyliques, TG = triglycérides, AGL = acides gras libres, DG = diglycérides, MG = monoglycérides

TABLEAU III. — Taux de conversion en fonction de l'activité de l'eau
Transestérification catalysée par les cellules de *Candida deformans* (30 % P/P)

Eau totale (mg)	22,6	27,6	32,6	42,6	52,6	62,6	72,6	172,6	272,6	772,6
Taux d'hydratation des cellules (%)	2,9	3,5	4,1	5,3	6,4	7,5	8,6	18,4	26,2	50,2
Taux d'hydratation du mélange réactionnel (%)	0,68	0,82	0,97	1,27	1,55	1,85	2,14	4,94	7,58	18,86
a_w 25 °C	0,22	0,25	0,29	0,34	0,39	0,45	0,50	0,63	0,77	0,91
12 · 0 (% molaire)	5,1	5,6	6,0	5,8	5,3	4,4	3,3	1,8	0,8	0,4
Taux de conversion (%)	15,9	17,5	18,8	18,1	16,6	13,8	10,3	5,6	2,5	1,3

TABLEAU IV. — Taux de conversion en fonction de l'activité de l'eau
Transestérification catalysée par le mycélium de *Rhizopus arrhizus* (20 % P/P)

Eau totale (mg)	9	14	19	29	39	49	59	159	259	759
Taux d'hydratation du mycélium (%)	1,6	2,5	3,3	5,0	6,6	8,2	9,7	22,4	32,0	58,0
Taux d'hydratation du mélange réactionnel (%)	0,29	0,45	0,61	0,92	1,24	1,55	1,86	4,87	7,70	19,64
a_w 25 °C	0,26	0,30	0,33	0,36	0,40	0,44	0,49	0,61	0,73	0,89
12 · 0 (% molaire)	9,4	9,9	9,8	9,5	8,6	7,0	5,4	4,3	2,0	1,0
Taux de conversion (%)	29,4	30,9	30,6	29,7	26,9	21,9	16,9	13,4	6,3	3,1

TABLEAU V. — Estimation des glycérides partiels et des acides gras libres apparus en fonction de l'activité de l'eau
(en % pondéral) - Transestérification catalysée par les cellules de *Candida deformans* (30 % P/P)

Activité de l'eau mesurée à 25 °C										
	0,22	0,25	0,29	0,34	0,39	0,45	0,50	0,61	0,77	0,91
EM	9,7	9,4	8,5	8,8	8,7	9,0	9,5	9,7	9,4	9,6
TG	85,8	85,6	86,2	85,0	84,4	83,4	81,8	79,4	73,6	67,6
AGL	2,5	2,7	2,9	3,4	3,6	4,1	4,6	5,8	9,9	13,5
DG	2,0	2,1	2,2	2,5	2,9	3,1	3,5	4,4	6,1	8,0
MG	—	0,2	0,2	0,3	0,4	0,4	0,6	0,7	1,0	1,3

TABLEAU VI. — Estimation des glycérides partiels et des acides gras libres apparus en fonction de l'activité de l'eau
(en % pondéral) - Transestérification catalysée par le mycélium de *Rhizopus arrhizus*, (20 % P/P)

Activité de l'eau mesurée à 25 °C										
	0,26	0,30	0,33	0,36	0,40	0,44	0,50	0,59	0,75	0,89
EM	10,0	8,3	8,7	9,0	8,9	8,6	9,2	9,0	9,1	9,9
TG	84,1	85,0	84,2	82,9	82,4	81,4	78,9	75,8	65,6	54,8
AGL	3,4	3,8	4,0	4,8	5,2	5,8	7,2	9,0	15,2	21,3
DG	2,5	2,7	2,8	2,9	3,0	3,5	3,8	5,2	8,9	12,5
MG	—	0,2	0,3	0,4	0,5	0,7	0,9	1,0	1,2	1,5

drolyse. Cependant on constate que la quantité d'acides gras libérés (3 à 7 %) varie proportionnellement à la quantité d'eau fixée. Parallèlement la quantité de diglycérides varie de 2,6 à 4,3 %.

- Pour des valeurs de l'activité de l'eau de 0,6 à 0,9, (zone BD Fig. 1) dans laquelle on assiste à une diminution progressive du taux de conversion, la vitesse de la lipolyse augmente très rapidement : la quantité d'acides gras libérés est de plus en plus importante (9,4 à 20,5 %) et la formation de diglycérides croît de 5,6 à 10,3 %. Dans cet intervalle d'activité où apparaît une nouvelle phase aqueuse, la réaction d'hydrolyse est favorisée au détriment de la transestérification et cela d'autant plus que la teneur en eau s'accroît dans le milieu.

- Pour des valeurs de l'activité de l'eau comprises entre 0,40 et 0,45, $a_w = 0,43$ correspondant au taux de conversion optimal, les quantités de diglycérides et d'acides gras libres apparus sont faibles (respectivement 3,5 % et 5,1 %) et sont compatibles avec un raffinage ultérieur chimique ou physique.

- Cette étude montre également qu'aux faibles activités de l'eau, la réaction d'hydrolyse se manifeste tout de même et qu'il est expérimentalement pratiquement impossible de déterminer le seuil de cette réaction dans la mesure où l'on ne peut pas enlever toute l'eau du mélange réactionnel et que des traces suffisent pour détecter le début de cette activité. On peut tout de même extrapoler et penser que s'il était possible d'atteindre une a_w de l'ordre de 0,1, la réaction d'hydrolyse serait probablement négligeable mais il n'est pas évident que la réaction d'interesterification ait encore lieu.

2. — Cas des cellules de *Candida deformans* et *Rhizopus arrhizus*.

Les mélanges réactionnels ont la composition suivante : 2,5 g d'huile de coprah et 55 mg de stéarate de méthyle dans lesquels sont ajoutés 30 % (P/P) soit 760 à 770 mg de cellules de *Candida deformans* contenant 2,6 % d'eau (mélange I) ou 20 % (P/P) soit 540 à 560 mg de mycélium de *Rhizopus arrhizus* contenant 1,2 % d'eau (mélange II).

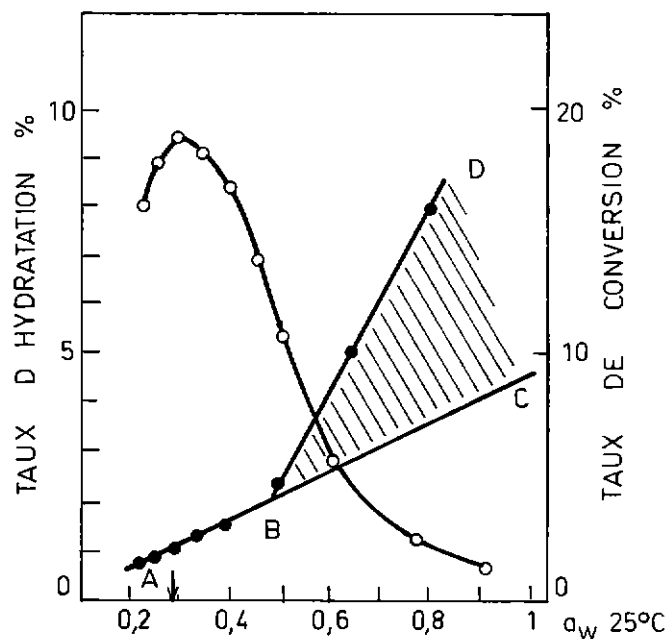


FIG 2 — Courbe de sorption - Transestérification catalysée par *Candida deformans*.
●—● taux d'hydratation, ○—○ taux de conversion.

Le mélange I contient 23 mg d'eau soit 0,7 % et le mélange II renferme 9 mg d'eau soit 0,3 %. Deux séries de réaction de transestérification sont effectuées à 50 °C pendant 4 h pour *Candida deformans* et pendant 3 h pour *Rhizopus arrhizus* et ceci pour une gamme croissante de quantité d'eau totale.

On détermine les activités de l'eau à 25 °C et on dose par CPG le % molaire de C12:0 incorporé au stéarate de méthyle. Le taux de conversion est calculé par rapport au % molaire maximal obtenu à l'équilibre. Les résultats sont consignés dans le tableau III pour *Candida deformans* et le tableau IV pour *Rhizopus arrhizus* et permettent de tirer les observations suivantes :

- le taux de conversion optimal est atteint pour une activité de l'eau de 0,29 et 0,33 respectivement pour *Candida deformans* et *Rhizopus arrhizus*, ce qui correspond à 28 et 14 mg d'eau totale pour l'un et l'autre mélanges, soit 1,0 et 0,5 % d'hydratation pour les mélanges réactionnels ;

- l'affinité eau-cellules étant infiniment plus grande que l'affinité eau-corps gras comme dans le cas du Lipozyme T_M, le taux d'hydratation des cellules est estimé à 7,1 % (*Candida deformans*) et 7,2 % (*Rhizopus arrhizus*) ;

- dans les 2 cas, l'activité de l'eau doit être maintenue entre 0,25 et 0,35 ;

- pour des valeurs d'activité de l'eau supérieures à 0,8, l'activité de transestérification est encore perceptible dans les 2 cas (1,3 % de taux de conversion pour *Candida deformans* et 3,1 % pour *Rhizopus arrhizus* quand $a_w = 0,91$) ;

- les courbes de sorption (Fig. 2, 3) font apparaître également 3 zones et appellent les mêmes commentaires que dans le cas du lipozyme. Cependant la phase aqueuse solvante apparaît plus tôt pour a_w 0,45 c'est-à-dire pour une activité de l'eau beaucoup plus faible que dans le cas du lipozyme où elle apparaît vers 0,60.

L'estimation des acides gras libres et des glycérides partiels apparus en fonction de l'activité de l'eau, est consignée dans les tableaux V et VI ; l'examen des valeurs autorise les commentaires suivants :

- pour les valeurs de a_w comprises entre 0,25 et 0,5, la réaction de transestérification est plus importante que celle d'hydrolyse. L'évolution de la vitesse de la lipolyse est

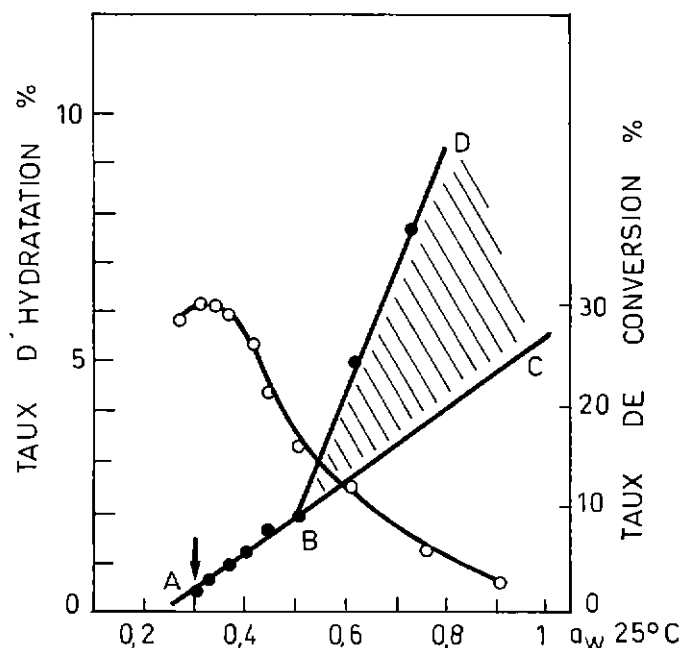


FIG 3 — Courbe de sorption - Transestérification catalysée par *Rhizopus arrhizus*.
●—● taux d'hydratation, ○—○ taux de conversion

linéaire dans cet intervalle et la quantité d'acides gras libérés (2,5 à 4,6 % pour *Candida deformans* et 3,4 à 7,2 % pour *Rhizopus arrhizus*) varie proportionnellement avec la quantité d'eau, la quantité de diglycérides variant respectivement de 2,0 à 3,5 % et de 2,5 à 3,8 % ;

— pour les valeurs de a_w comprises entre 0,5 et 0,9, la réaction d'hydrolyse est favorisée au fur à mesure que la teneur en eau s'accroît dans le milieu. L'évolution de la vitesse d'hydrolyse est encore linéaire mais varie beaucoup plus rapidement que dans la zone précédente. Le taux d'acides gras libérés passe de 5,8 à 13,5 % par *Candida deformans* et de 9,0 à 21,3 % pour *Rhizopus arrhizus* ; le taux de diglycérides varie respectivement de 4,4 à 8,0 % et de 5,2 à 12,5 %. Ces résultats se rapprochent de ceux de Caillat et Drappon [17] qui, étudiant le comportement de la lipase du blé en milieu solide en fonction de l'activité de l'eau, ont montré que l'activité lipolytique augmente proportionnellement pour a_w compris entre 0,3 et 0,8 ;

— aux valeurs maximales de taux de conversion, c'est-à-dire pour une activité de l'eau voisine de 0,3, les teneurs en acides gras (2,9 et 3,8 %) et en diglycérides (2,2 et 2,7 % respectivement pour *Candida deformans* et *Rhizopus arrhizus*) sont également compatibles avec un raffinage chimique ou physique. Pour les mêmes raisons que dans le cas du lipozyme, à savoir qu'on ne peut expérimentalement éliminer les traces d'eau qui suffisent à provoquer la réaction d'hydrolyse, il n'est pas possible de déterminer un seuil de démarrage de cette réaction, car elle nécessiterait d'avoir une activité de l'eau pratiquement nulle. Or, dans ces conditions, il n'est pas certain que la transestérification ait lieu.

CONCLUSION

Cette étude a donc permis de démontrer que l'interestérification en milieu fondu biocatalysée par les lipases, indépendamment de leur éventuelle régiosélectivité nécessite la

détermination de l'activité de l'eau pour permettre de préparer les mélanges réactionnels en fixant les taux d'hydratation de façon optimale. Dans ces conditions la réaction de transestérification est privilégiée par rapport à l'hydrolyse. La réversibilité d'action des lipases fait que ces 2 réactions sont compétitives et sont directement liées à l'activité de l'eau dans les milieux peu hydratés.

Il est impossible de s'affranchir totalement de la réaction d'hydrolyse qui est toujours plus ou moins présente, mais il n'est pas possible expérimentalement de trouver des conditions telles que les taux d'hydratation et les activités de l'eau soient inférieurs au seuil nécessaire pour éliminer totalement cette réaction gênante, sans compromettre également l'efficacité de la réaction d'interestérification. Toutefois pour obtenir les résultats les plus satisfaisants, il a pu être démontré que dans tous les cas, l'activité de l'eau doit être comprise entre 0,25 et 0,45, ce qui correspond à des taux d'hydratation des mélanges réactionnels compris entre 0,5 et 1 %. En deçà de 0,25, l'activité des biocatalyseurs est trop faible et au-delà de 0,45 c'est la réaction d'hydrolyse qui prend le pas sur l'interestérification.

Ainsi, pour clore cette étude sur l'aptitude à la transestérification catalysée par des lipases régiosélectives 1-3, après avoir défini dans un premier temps les activités spécifiques de transestérification permettant la sélection des biocatalyseurs, après avoir ensuite étudié l'activité de l'eau permettant de trouver les conditions d'hydratation idoines, le dernier point crucial à aborder est de savoir si dans les limites des durées réactionnelles applicables industriellement, la régiosélectivité 1-3 des biocatalyseurs est conservée tout au long de la réaction, ce qui est fondamental. En effet si ce dernier point s'avérait négatif, l'intérêt même de cette application serait *ipso facto* caduc. Cette vérification fait l'objet de la Partie III (1).

(1) Cette III^e partie « Stabilité de la régiosélectivité 1-3 » paraîtra dans le prochain numéro d'Oléagineux de décembre 1988.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] FUJI OIL Co Ltd, (1981). — Brevet : E 0.035.883
- [2] KOSLOWSKY L. (1975). — *Grasas y Aceites*, **26**, p. 95-103.
- [3] LONCIN M. (1958). — *Oléagineux*, **13**, N° 1, p. 33-37
- [4] BERGER K. G. (1977). — *Oil Palm News*, **22**, p. 10-12
- [5] JACOSBERG B. et OH CHUAN OH (1976). — *J. am. Oil Chem. Soc.*, **53**, p. 609-617.
- [6] BERGER K. G. (1975). — *Chem. Ind. (London)*, **21**, p. 910-913.
- [7] YELLA REDDY S. et PRABHAKAR J. V. (1986). — *J. am. Oil Chem. Soc.*, **63**, p. 672-676
- [8] MUDERHWA J., PINA M. et GRAILLE J. (1988). — *Oléagineux*, **43**, N° 10, p. 385-392
- [9] ROSSEL J. B. (1986). — In *Analysis of oils and fats*, p. 55-59, Ed by Hamilton R. J. and Rossel J. B., Elsevier science publishers, London and New York
- [10] TOURAINE F. (1986). — Thèse de Doctorat « Physiologie Végétale Appliquée ». Université Pierre et Marie Curie. Paris VI
- [11] CHEFTEL J. C. et CHEFTEL H. (1976). — In *Introduction à la biochimie et à la technologie des aliments*. Vol. 1 « Activité de l'eau » (1976), p. 6-8. Technique et Documentation - Lavoisier (Paris)
- [12] LONCIN M. (1976). — In *Génie industriel alimentaire - Aspects fondamentaux* p. 150-151, Ed. Masson (Paris).
- [13] DRAPPON R. (1972). — *Ann. Technol. Agric.*, **21**, p. 487-499
- [14] HANSEN T. T. et EIGTVED P. (1986). — In *Proceeding of the world Conference on emerging technologies in the fats and oils industry*, p. 365-369. Ed by Baldwin A. R. Amer. Oil Chem. Soc. Printed in USA.
- [15] KUNTZ I. D. and KAUZMANN W. (1974). — *Adv. Prod. Chem.*, **28**, p. 239-345
- [16] GUILBOT A. et LINDERBERG A. B. (1960). — *Biochem. Biophys. Acta*, **39**, p. 389-397.
- [17] CAILLAT J. M. et DRAPPON R. (1974). — *Ann. Technol. Agric.*, **23**, p. 273-286

SUMMARY

Transesterification ability of a few 1-3 regio-selective lipases.

II. — Conversion rate and partial glycerides depending on biocatalyst water activity.

J. M. MUDERHWA, M. PINA and J. GRAILLE, *Oléagineux*, 1988, 43, N° 11, p. 428-433.

The development of biocatalyzed interesterification reactions in a melted medium by 1-3 regio-selective lipases, previously selected for their transesterification activity, requires investigation into the effects of water activity. The study of this parameter makes it possible to define suitable hydration conditions under which the best biocatalyzer performance can be obtained and to minimize parasite hydrolysis reactions which adversely effect the quality of the products obtained, whose free fatty acid and partial glyceride contents should be as low as possible. It is inevitable that the 2 reactions take place simultaneously, and even compete with each other; it is also experimentally impossible to determine a water activity threshold below which hydrolysis would not take place. In all cases, the best results were obtained with water activity between 0,25 and 0,45, which corresponds to reaction media hydration rates of around 0.5-1 %.

RESUMEN

Habilidad de algunas lipasas regioselectivas 1-3 para la transesterificación. II. — Coeficiente de conversión y glicéridos parciales en función de la actividad del agua de biocatalizadores.

J. M. MUDERHWA, M. PINA y J. GRAILLE, *Oléagineux*, 1988, 43, N° 11, p. 428-433.

Para puntualizar reacciones de interesterificación biocatalizada medio sin disolvente por lipasas regioselectivas 1-3, seleccionadas antes por su actividad de transesterificación, se necesita estudiar la influencia de la actividad del agua. El estudio de este parámetro permite definir las condiciones adecuadas de hidratación que corresponden a biocatalizadores de resultados más destacados, reduciendo al mínimo la reacción parásita de hidrólisis que perjudica la calidad de los productos obtenidos; además los contenidos de ácidos grasos libres y de glicéridos parciales de los productos obtenidos deben limitarse lo más posible. La simultaneidad y hasta la competencia de las dos reacciones no pueden evitarse, y es imposible establecer de modo experimental un umbral de actividad del agua hasta el cual la hidrólisis no podría efectuarse. De todos modos los mejores resultados se lograron para una actividad del agua comprendida entre 0,25 y 0,45, que corresponden a unos porcentajes de hidratación de los medios de reacción del orden del 0.5 al 1 %.

**TRANSPORTEURS
A CHAINE**

30 - 50 - 100 - 150 - 200 t/h

DENIS manutention
nettoyage
stockage

28160 BROU - Tél. 37 47 05 08
Télex 760 789 - Télécopieur 37 47 07 22

PROMEGA